



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

치의학박사 학위논문

사람 치수세포의 염증인자 및  
분화에 대한 치과용 MTA의 영향 및  
Quercetin과 Phenamil의 분화촉진효과

Effects of Dental Mineral Trioxide Aggregate on  
Inflammatory Factors and Differentiation of Human  
Dental Pulp Cells, and Differentiation-Stimulatory Effects  
of Quercetin and Phenamil

2014년 2월

서울대학교 대학원  
치학과 치과생체재료과학 전공  
김 종 길

# 사람 치수세포의 염증인자 및 분화에 대한 치과용 MTA의 영향 및 Quercetin과 Phenamil의 분화촉진효과

지도교수 양형철

이 논문을 치의학박사 학위논문으로 제출함

2013년 10월

서울대학교 대학원

치위학과 치과생체재료과학 전공

김 종 길

김종길의 치의학박사 학위논문으로 인준함

2013년 12월

위 원 장 임 범 순 (인)

부위원장 양 형 철 (인)

위 원 서 덕 규 (인)

위 원 이 상 훈 (인)

위 원 고 영 무 (인)

국문초록

사람 치수세포의 염증인자 및 분화에 대한  
치과용 MTA의 영향 및  
Quercetin과 Phenamil의 분화촉진효과

서울대학교 대학원 치의학과 치과생체재료과학 전공  
(지도교수 양 형 철)

김 종 길

치수의 생활력을 유지시키고 침습적인 치료를 피하기 위해 노출된 치수에 생체적합성 재료를 적용하여 수복상아질을 유도하는 술식을 치수복조술이라고 한다. 치수복조제 하방에 새로 형성된 상아질은 치수복조치료의 예후를 결정하는 중요한 지표이다. 수산화칼슘은 오랫동안 치수복조제로 사용되어 왔으나 많은 실패가 보고되면서 MTA (Mineral Trioxide Aggregate)가 수산화칼슘을 대체하는 효과적인 치수복조제로 주목받게 되었다. 한편 조골세포를 활성화시키는 것으로 확인된 성장인자 등의 물질을 대상으로 치수세포로부터 상아모세포 분화촉진을 확인하는 많은 연구가 있었다. 그 중에서도 특히 플라보노이드는 조작과 저장에 용이한 생활성 저분자 물질이라는 점에서 주목할 만한 가치가 있다. 본 논문의 목적은, 시판되는 3종의 MTA (MTA-Angelus, ProRoot MTA, Ortho MTA)를 이용하여 염증과 분화에 관련된 다양한 세포 반응을 고찰하고 골 분화능이 확

인된 생활성 저분자 물질들 (3종의 플라보노이드와 phenamil)의 상아질 형성능력을 평가하는 것이다. 실험에 사용된 모든 MTA에서 염증반응과 관련된 COX-2는 증가되지 않았고 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 COX-2 발현은 MTA에 의해 저해되지 않았는데, 이는 MTA에 의한 염증 반응에는 COX-2가 관여하지 않는다는 것을 의미한다. 초기 24시간 동안 추출된 모든 MTA 추출물은 사람 치수세포의 ALP 활성을 증가시켰으나 1-3일 및 3-6일 동안 추출된 MTA-Angelus와 ProRoot MTA 추출물은 ALP 활성을 감소시켰는데, 이는 두 MTA 추출물 성분에 활성을 감소시키는 성분이 존재함을 시사한다. ProRoot MTA는 DMP-1 mRNA 발현을 증가시켰지만 DSPP mRNA 발현에는 영향을 미치지 못했다. 그러나 다른 두 MTA는 DSPP, DMP-1, OCN, OPN의 mRNA 발현을 증가시키지 못했는데 이는 ALP 활성 측정결과와 일치하지 않는다.

3종의 플라보노이드 (quercetin, genistein, baicalin) 중에서는 quercetin이 사람 치수세포의 ALP 활성을 가장 많이 유도하였고, amiloride 일종인 phenamil은 quercetin보다 활성을 더욱 많이 유도하였다. 그러나 DSPP mRNA의 발현과 사람 치수세포의 광화는 quercetin으로 처리한 세포에서 더욱 증가되었는데, 이는 quercetin의 상아모세포 분화유도능력이 가장 우수하다는 것을 의미한다. Quercetin으로 처리한 세포에 ICI 182,780 (estrogen receptor inhibitor)을 첨가했을 때, ALP 활성에는 변화가 없었고, PD98059 (ERK1/2 inhibitor)를 첨가했을 때에는 ALP 활성이 일부 감소하였다. 이는 quercetin에 의해 유도된 사람 치수세포의 분화 과정에서 estrogen receptor의 매개없이 ERK1/2가 활성화된다는 것을 의미한다.

추후 MTA를 이용한 치수복조술에 플라보노이드가 전처리제 또는 보조제로 사용되기 위해서는, 사람 치수세포의 분화촉진에 MTA와 플라보노이드의 시너지 효과를 입증하는 연구가 필요하다.

---

주요어: 사람 치수세포, 상아모세포 분화, MTA, Quercetin, Phenamil,  
ERK

학 번: 2008-31051

# 목 차

I. 서론	1
II. MTA의 독성, 염증반응 및 사람 치수세포 분화에 대한 영향	
II-1. 서론	5
II-2. 실험 방법	7
II-3. 실험 결과	12
II-4. 고찰	20
II-5. 결론	22
III. 플라보노이드의 사람 치수세포 분화에 대한 영향 및 신호전달경로	
III-1. 서론	23
III-2. 실험 방법	26
III-3. 실험 결과	31
III-4. 고찰	41
III-5. 결론	43
IV. 종합결론	44
참고문헌	45
Abstract	55

## List of Figures

Figure 1. Cell viability of RAW 264.7 cells treated with serial dilutes of the extracts of ProRoot MTA (A), Ortho MTA (B) and MTA-Angelus (C) for 24 hrs. -----	13
Figure 2. Cox-2 mRNA expression in RAW 264 cells treated of MTA extracts (A) and co-treated with MTA extracts and LPS (B). -----	15
Figure 3. ALP activity of HDP cells treated with MTA extracts.-----	17
Figure 4. mRNA expression of DSPP (A), DMP-1 (B), OCN (C) and OPN (D) in HDP cells treated with MTA extracts.----	19
Figure 5. Chemical structures of quercetin, genistein, baicalin, and phenamil. -----	25
Figure 6. Effects of small chemicals on cell viability (A) and ALP activity (B) in HDP cells. -----	32
Figure 7. mRNA expression of DSPP and OCN in quercetin- and phenamil-treated cells. -----	35
Figure 8. Mineralization of HDP cells exposed to quercetin and phenamil. -----	37
Figure 9. Effects of ICI 182,780 and PD89059 on the ALP activity of quercetin-treated HDP cells. -----	38
Figure 10. Protein expression of p-ERK, DSPP and OCN in quercetin-treated HDP cells. -----	40



## I. 서론

치아의 수명을 연장시키기 위해서는 치아를 둘러싸고 있는 치아 주위조직의 건강은 물론, 치수의 생활력을 최대한 오랫동안 유지시켜야 한다. 치수의 생활력을 위협하는 요소에는 치아우식증, 외상, 치과의사에 의한 우발적인 손상 등이 있는데, 치수에 대한 자극이 미약하고 일시적이면 치수의 생활력이 다시 회복되기도 하지만 자극이 심각하고 지속적이면 비가역적인 감염으로 인하여 치수를 제거하고 근관을 밀폐시키는 근관치료가 불가피하다. 치수의 생활력을 유지시키고 침습적인 치료를 피하기 위해 치수에 생체적합성 재료를 적용하여 수복상아질 (reparative dentin)을 유도하는 술식을 치수복조술 (pulp capping)이라고 하는데, 노출된 치수에 직접 적용하는 경우에는 직접 치수복조술 (direct pulp capping), 얇게 잔존한 상아질 위에 적용하는 경우에는 간접 치수복조술 (indirect pulp capping)이라고 한다 (1).

치수복조제 (pulp capping agent) 하방에 새로 형성된 상아질은 외부의 자극과 미생물의 침입에 대한 방어막이 되어서 궁극적으로 치수세포의 수명을 연장시킨다. 이러한 dentin bridge의 형성은 치수복조치료의 예후를 결정하는 지표로 간주되고 있다.

수산화칼슘은 1939년 Zander의 연구 이후로 치수복조제의 gold standard가 되어왔다 (2). 그러나 오랫동안의 임상 연구 결과, 수산화칼슘을 이용한 치수복조술의 실패율이 시간이 지남에 따라 증가되는 것이 관찰되었다 (3). 수산화칼슘을 이용한 치수복조술의 단점으로 알려진 것은, 점진적인 분해 (gradual degradation)와 신생 상아질의 tunnel defects, 염증세

포의 높은 발현빈도, 치수의 부분괴사 (localized areas of pulp necrosis) 등 이다 (4-7).

치수복조술의 실패로 인하여 더욱 침습적인 근관치료를 하게 되는 빈도를 줄이기 위해서는 수산화칼슘의 단점을 극복하는 새로운 치수복조제에 대한 요구가 불가피 하였고, mineral trioxide aggregate (MTA)를 적용한 실험들은 그러한 기대에 상응하는 다양한 결과를 보여주었다. 원송이를 이용한 MTA 치수복조실험을 통하여 수산화칼슘보다 우수한 치수복조제로서의 가능성이 처음 제시되었다 (8). MTA 치수복조술의 높은 성공률은, 경화 후 알칼리성을 띄며 입자 크기가 작아 뛰어난 밀폐효과가 있고 시간이 지나면서 칼슘이온을 방출하는 특징 등에 기인하는 것으로 알려져 있다. MTA는 치수와 직접 접촉하여 dentin bridge를 형성하는 것으로 알려졌고 (9), 이는 치수보호에 긍정적인 역할을 하는 것으로 인식되며, dentin bridge 형성은 MTA의 calcium성분 유출이 주요한 원인으로 알려져 있다. 백서 치수세포에서 행해진 *in vitro* 광화촉진 실험 결과는 *in vivo* dentin bridge 형성이 MTA에 의한 것임을 뒷받침한다 (10).

MTA는 치수세포뿐 아니라 조골세포의 bone sialoprotein, collagen, osteocalcin mRNA 발현을 촉진하는 것으로 보고된 바 있으며 (11), 골형성 주요인자인 Runx2의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다 (12). 또한, MTA는 osteoclast의 골흡수 활성을 저해하고, apoptosis를 촉진시키는 것이 확인되었다 (13). 이상의 연구들을 종합해 볼 때, MTA는 생체 내에서 상아질 및 골 형성에 기여하는 바, 경조직 재생을 촉진하는 성질을 지니고 있는 것으로 보인다.

치수복조제로서 상아질 분화를 촉진하는 MTA가, 조골세포에 대한 분화

능력을 가진다는 사실은, 반대로 조골세포의 분화를 촉진하는 물질들 또한 치수복조제로서의 적용이 가능하리라는 것을 시사한다. 이러한 가정 하에, 조골세포를 활성화시키는 것으로 확인된 성장인자들을 대상으로 치수세포로부터 상아모세포 분화촉진을 확인하는 많은 연구가 있었다. Thesleff 등은 쥐의 대구치를 이용한 실험에서 transforming growth factor  $\beta$ -1 (TGF  $\beta$ -1) 및 int-2 (proto-oncogene coding for a fibroblast growth factor-related protein)가 상아모세포 분화를 유도하는 것을 밝혔고 (14), Lovschall 등은 쥐를 이용한 치수복조 실험에서 recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGFI)가 상아질형성을 유도하는 것을 밝혔다 (15). recombinant human bone morphogenic protein-2 및 4 (BMP-2,4)가 개의 치수에서 상아질 형성을 유도하고 (16), BMP-7이 원숭이의 상아-치수 복합체 형성을 촉진하는 것이 보고되었다 (17).

그러나 이러한 성장인자들을 치수복조제로 적용하기 위해서는 여러가지 제약이 있다. 우선 치수복조가 시행되는 공간은 매우 협소하므로 의도한 양과 농도를 유지할 수 있도록 세심한 조작이 필요하다. 게다가 성장인자들은 여전히 고가(高價)이고 활성을 유지하기 위한 저장에 있어서 주의가 따른다. 즉 술자의 숙련도와 술식의 환경에 따라서 치수복조술의 결과가 크게 달라질 수 있다. 성장인자들이 가지고 있는 이러한 단점들을 극복하기 위하여 상대적으로 안정된 화학구조를 가진 생활성 저분자물질 (bioactive small molecules)이 상아질 재생연구에 보다 현명한 선택이 될 수 있을 것이다. 이에 우리는 골형성을 촉진한다고 확인된 저분자 물질 중, 특히 플라보노이드를 선택하여, 이 물질들이 사람 치수세포의 분화를 촉진

진할 것이라는 가설을 세우고 이를 입증할 실험을 시행하였다.

우선, 시판 중인 3종의 MTA에 대하여 치수복조제로서의 적합성을 확인하기 위한 염증 및 분화 관련 실험을 시행하였다. 또한 조골능력이 입증된 플라보노이드의 사람 치수세포 분화에 대한 영향을 확인하기 위하여 염증 및 분화, 광화 관련 실험을 시행하였다.

## II. MTA의 독성, 염증반응 및 사람 치수세포 분화에 대한 영향

### II-1. 서론

MTA는 1990년대에 치과 근관치료용으로 개발되었으며, 1998년에 미국 FDA에 의해 정식으로 임상적용이 승인되었다. MTA는 우수한 생체적합성, 밀폐성, 항균성 등으로 최근 사용이 증가하고 있으며, 국내외에서 다양한 제품의 개발이 활발히 진행되고 있다.

MTA는 portland cement (75%), bismuth oxide (20%), gypsum (5%)의 혼합물로서 주성분을 이루는 portland cement는 dicalcium silicate ( $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ ), tricalcium silicate ( $3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ ), tricalcium aluminate ( $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$ ) 등의 혼합물이다. MTA는 또한  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  등을 미량 포함하고 있다.

MTA는 iron, aluminium, magnesium oxide의 함량에 따라 gray MTA와 white MTA의 두 가지 종류로 나누어질 수 있으며, 색의 차이와 함께 입자의 크기도 다른 것으로 알려져 있다. MTA는 수화과정 중  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 생성하는데, 이는 수화 MTA의 초기 pH의 상승 원인이 될 수 있으며, 구강 안에서 인접조직에 영향을 줄 수 있다.

MTA의 세포독성, 유전독성, 염증반응에 대한 연구에 따르면, MTA는 전반적으로 경미한 수준의 독성 및 염증발현을 보인다 (18-20). MTA는 아말감 보다 세포독성이 약하며 (21), portland cement와는 세포독성의 차이가 없는 것으로 보고되었다 (22). 방사선 불투과성 목적으로 MTA에

혼합된 bismuth oxide는, 다양한 농도에서 세포독성을 측정한 결과, 독성을 나타내지 않는 것으로 보고되었다 (23).

Camargo 등의 연구에서는 white MTA와 gray MTA 모두 세포독성과 유전독성이 없는 것으로 보고하였으나 (24), Koulaouzidou 등은 MTA의 종류에 따라 세포독성의 차이가 있음을 보여주었다 (18). 이러한 차이는 세포독성 측정을 위한 시료의 제조방법 및 사용된 세포의 종류에 기인하는 것으로 생각되나, 전반적으로 MTA 세포독성은 다른 근관치료용 재료에 비해 세포독성이 약한 것으로 판단된다. 따라서 세포독성에 의한 염증발현의 가능성은 낮은 것으로 보인다.

또한, 동물을 이용한 *in vivo* 실험과 임상연구에서, MTA와 직접 접촉하는 치수에서의 염증발현은 경미하며 지속적이지 않은 것으로 보고되고 있다 (25,26). 그러나 관찰된 염증발현이 MTA의 생체적합성에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 평가는 아직 유보적이며, 다양한 관찰시간과 MTA의 종류를 달리한 연구가 필요하다. 이러한 맥락으로 본 연구에서는 시판되고 있는 MTA의 세포독성을 비교하고 염증발현 인자인 cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA 발현에 미치는 MTA의 영향을 조사하였다.

세포독성에 의한 염증발현에 대한 검증과 더불어 MTA가 가지는 경조직형성능력을 알아보기 위하여 사람 치수세포의 alkaline phosphatase (ALP) 활성과 치수분화 마커인 dentin sialophosphoprotein (DSPP) 및 dentin matrix protein-1 (DMP-1), 그리고 뼈세포 분화 마커로 이용되는 osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) 등에 대한 MTA의 영향을 조사하였다. 특히, MTA 추출시기를 달리하여 치수세포 분화에 대한 영향도 평가하였다.

## II-2. 실험 방법

### 시약 및 세포배양

MTA는 white MTA 계열의 ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, OK, USA), Ortho MTA (BioMTA, Seoul, Korea) 및 MTA-Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brazil)를 사용하였다. COX-2 mRNA 분석을 위해서 mouse macrophage cell line RAW 264.7 (ATCC, Rockville, MD)을 사용하고 상아모세포 분화에 대한 영향 분석을 위해서는 사람 치수세포를 배양하였다. 사람 치수세포는 서울대학교 치과병원 기관윤리위원회 (IRB; Institutional Review Board of Seoul National University Dental Hospital)의 승인을 받아, 교정 목적으로 발치된 치아를 사용하였다. 세포는 4.5g/L glucose, 10% fetal bovine serum (FBS), 항생물질용액 (100 U/mL penicillin-g, 100µg/mL streptomycin)을 포함한 Dulbecco Modified Eagle (DME) 배지에서 배양하였으며, 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기가 공급되며 37°C가 유지되는 배양기를 사용하였다. 세포독성, ALP 활성측정 등을 위하여 적절한 농도 ( $0.8 \times 10^5$  cells/ml)의 세포를 well plate에서 배양하여 이용하였다.

세포배양에 사용되는 배지 및 시약은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 본 연구에서 특별히 언급되지 않은 시약은 Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### MTA 추출

수화 (hydrated) MTA 추출을 위하여, MTA 0.5g을 150µL 멸균 증류수

와 혼합하여 6-well plate에 골고루 퍼지게 한 후, 습윤 상태에서 24시간 동안 수화시켰다. 수화 후, DME 배지 5mL를 각 well에 넣고 37℃에서 72시간 동안 MTA를 추출하였다. 추출액은 10,000×G에서 10분 동안 원심분리하여 미세입자를 제거하고, 멸균 여과하여 실험에 사용하였다. 비수화 (unhydrated) MTA 추출은 위의 수화 과정을 제외하고 수행하였다.

## 세포독성시험

MTA를 세포배양액으로 추출한 후, 새로운 배양액으로 희석하여 세포독성시험에 사용하였으며, 세포활성은 Cell Counting Kit-8 (WST-8, Donjindo Laboratories, Gumamoto, Japan)으로 측정하였다 (27). 세포독성평가를 위해, 세포를 추출 희석액으로 well plate에서 처리한 후, 각 well의 배양액을 제거하고, WST-8이 10% 포함된 신선한 배양액으로 세포를 37℃에서 배양하였다. 배양 1시간 후, plate reader기 (Sunrise, TECAN, Salzburg, Austria)로 흡광도 (450 nm)를 측정하여 세포 활성을 평가하였다.

## ALP 활성 측정

MTA 추출액으로 사람 치수세포를 6일 동안 처리한 후 ALP 활성을 측정하였다 (28). 세포의 분화를 유도하기 위한 DME 배지에는 ascorbic acid (50 µg/mL), dexamethasone ( $10^{-8}$  M),  $\beta$ -glycerophosphate (2mM)를 포함하고 있다. ALP 활성 측정을 위해 4-nitrophenyl phosphate 비색측정법을 사용하였다. 96-well plate에서 MTA 추출물로 처리된 세포를



phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고 1.5M  $MgCl_2$ 와 67mM 4-nitrophenyl phosphate가 포함된 용액 10 $\mu$ L와 alkaline buffer solution 140 $\mu$ L를 각 well에 주입하였다. 37℃에서 30분 배양한 후, 0.5M NaOH를 첨가하여 반응을 종료시키고, 405nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 총 세포단백질 1 $\mu$ g 당 효소 활성으로 나타내었다. 단백질 함량은 bicinchoninic acid (BCA) 단백질 측정 kit (iNtRON Biot-technology)를 사용하여 측정하였다.

## Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용한 유전자 발현 측정

RAW 264.7세포의 COX-2 mRNA 발현과 사람 치수세포의 DSPP, DMP-1, OCN, OPN에 대한 MTA의 영향을 조사하였다. COX-2 mRNA 발현에 대한 영향 평가를 위해서는 RAW 264.7세포를 MTA 추출물로 6시간 처리하였으며, DSPP, DMP-1, OCN, OPN 발현을 위해서는 사람 치수세포를 추출물로 6일 동안 처리하였다. 배지는 3일 주기로 교환하였으며, 교환된 새 배지에도 MTA 추출물이 포함되어 있다. COX-2 처리군의 양성대조군으로 그람 음성균의 염증 발현인자인 lipopolysaccharide (LPS)를 사용하였다. DSPP 등의 발현을 위하여 사람 치수세포는 분화유도 DME 배지를 사용하였다.

MTA 추출물로 처리된 세포에서 전체 RNA를 RNA-purification Kit (WelPrep Total RNA Isolation Reagent, Welgene, Daegu, Korea)로 추출하였으며, 추출된 RNA로부터 cDNA 합성은 cDNA합성 kit (Power

cDNA Synthesis kit, iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)를 사용하였다 (29).

RT-PCR은 10 $\mu$ L SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio, Otsu, Japan), 0.4 $\mu$ L ROX Reference Dye II (Takara Bio), cDNA 및 primer가 포함된 혼합물 (20 $\mu$ L)에서 진행되었으며, ABI PRISM 7500 Sequence Detection System Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하였다. 사용된 primer의 sequence는 다음과 같다: COX-2, forward 5'-GAA GTC TTT GGT CTG GTG CCT G-3', reverse 5'-GTC TGC TGG TTT GGA ATA GTT GC-3'; DSPP, forward 5'-TGA CTC AAA AGG AGC AGA AGA TGA T-3', reverse 5'-ATT TAC CTT TGC CAC TGT CTG ATT T-3'; DMP-1, forward 5'-GTG AGT GAG TCC AGG GGA GAT AA-3', reverse 5'-TTT TGA GTG GGA GAG TGT GTG C-3'; OCN, forward 5'-GTG ACG AGT TGG CTG ACC-3', reverse 5'-CAA GGG GAA GAG GAA AGA AGG-3'; OPN, forward 5'-CAG ACG AGG ACA TCA CCT CA-3', reverse 5'-TGG CTG TGG GTT TCA GCA-3'; GAPDH, forward 5'-GTC GGA GTC AAC GGA TTT GG-3', reverse 5'-GGG TGG AAT CAT ATT GGA ACA TG-3'

각 유전자의 PCR 조건은 다음과 같다: COX-2, 95 $^{\circ}$ C (15초, denaturation)- 63 $^{\circ}$ C (34초, annealing)- 40cycle; DSPP, 95 $^{\circ}$ C (15초, denaturation)- 60 $^{\circ}$ C (34초, annealing)- 40cycle; DMP-1, 95 $^{\circ}$ C (15초, denaturation)- 62 $^{\circ}$ C (34초, annealing)- 40cycle; OCN, 95 $^{\circ}$ C (15초, denaturation)- 60 $^{\circ}$ C (34초, annealing)- 40cycle; OPN, 95 $^{\circ}$ C (15초, dena-

turation)- 60℃ (34초, anealing)- 40cycle; GAPDH, 95℃ (15초, de-naturation)- 60℃ (34초, annealing)- 40cycle. 각각의 유전자 발현의 정량은  $C_T$  (threshold cycle)값을 바탕으로 하였으며, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의  $C_T$ 값에 대한 비로 나타내었다.

## 통계처리

본 논문의 모든 실험값은 각각 독립적인 3번의 실험 결과의 평균이며, 통계처리가 필요한 경우 음성대조군 혹은 양성대조군과 실험군의 값을 Student's t-test로 비교 하였으며,  $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 정의하였다.

## II-3. 실험 결과

### RAW 264.7세포에 대한 MTA 세포독성

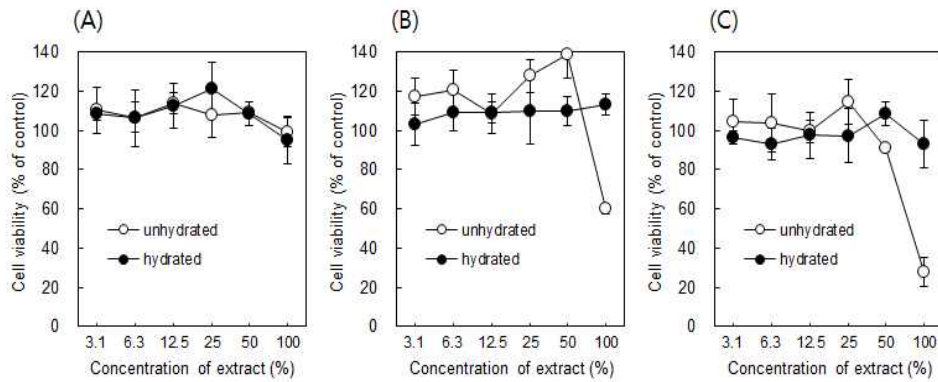
MTA 추출물로 RAW 264.7세포를 24시간 처리하여 세포독성을 측정한 결과, ProRoot MTA는 수화 여부에 관계없이 세포독성을 보이지 않았다 (Figure 1A). 희석한 추출액 뿐만 아니라 희석하지 않은 추출액 (100%)으로 처리한 세포 활성에서도 음성 대조군과 차이를 보이지 않았다. 따라서 ProRoot MTA는 본 논문에서 진행한 실험조건하에서는 세포독성이 없는 것으로 보인다.

비수화 Ortho MTA의 경우, 희석하지 않은 추출액 (100%)은 음성 대조군과 비교하여 약 60% 정도로 세포 활성이 감소되었고, 50% 추출액은 세포에 영향을 미치지 않았다 (Figure 1B). 그러나 수화된 경우에는 100% 추출액의 경우에도 세포 활성이 감소되지 않았다. 그러므로 Ortho MTA는 수화과정을 통해서 세포독성이 감소함을 알 수 있다.

MTA-Angelus도 Ortho MTA와 유사한 결과를 보였다 (Figure 1C). 즉, 수화되지 않은 경우 100% 추출액에서 세포독성을 보였으나, 수화과정을 거침으로써 세포독성이 감소하였다.

각각의 MTA를 비교하면, ProRoot MTA가 가장 적은 세포독성을 나타내었고, Ortho MTA와 MTA-Angelus가 비슷한 정도의 경미한 세포독성을 보였으며, 수화 과정은 세포독성을 경감시킨다고 할 수 있다.

### RAW 264.7세포의 COX-2 발현에 대한 MTA의 영향



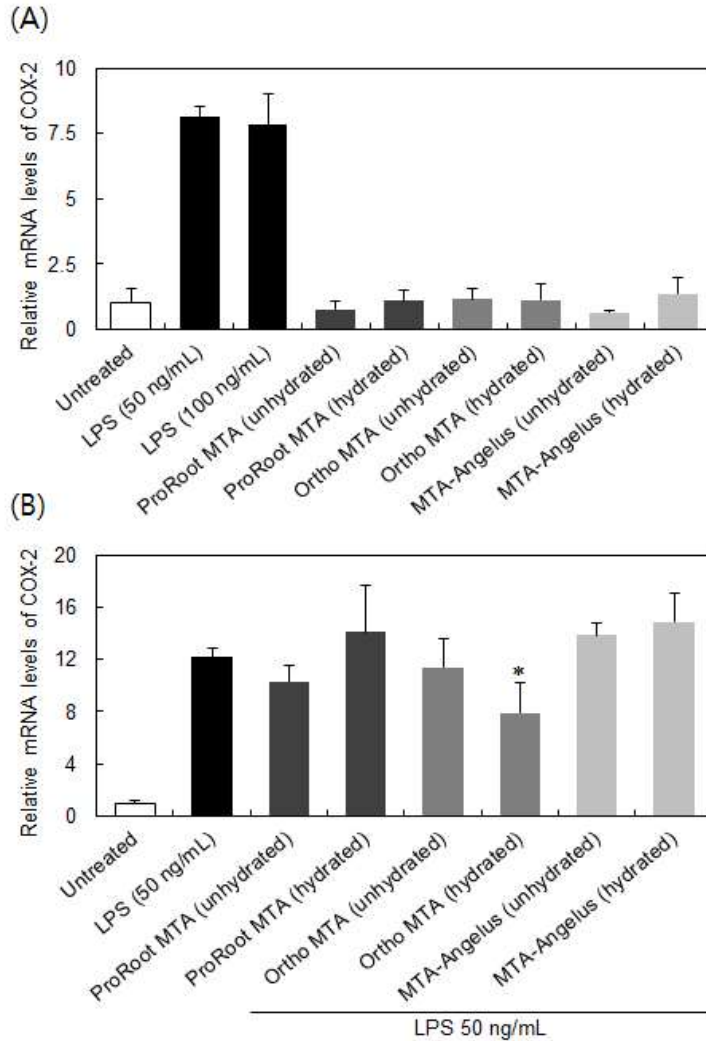
**Figure 1.** Cell viability of RAW 264.7 cells treated with serial dilutes of the extracts of ProRoot MTA (A), Ortho MTA (B) and MTA-Angelus (C) for 24 hrs. Each value represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments and is expressed as a percentage of the respective control values.

COX-2 mRNA 발현에 대한 영향을 평가하기 위해 수화 MTA, 비수화 MTA 모두 사용하였다. 비수화 MTA 추출물의 경우 50% 희석부터 세포 독성을 나타내지 않았으므로, 모든 추출물은 50% 희석액을 사용하기로 하였다. 6시간 동안 50 ng/mL LPS로 처리된 RAW 264.7세포에서는 음성대조군 보다 7.5배 이상으로 COX-2 mRNA 발현이 증가하였다 (Figure 2A).

LPS농도 50 ng/mL와 100 ng/mL는 통계적으로 차이를 보이지 않았으므로, LPS는 50 ng/mL 이하에서 이미 COX-2 mRNA 발현 촉진효과가 포화되었음을 알 수 있다. MTA 추출물은 사용된 모든 종류의 MTA가 수화여부에 관계없이 COX-2 mRNA 발현에 영향을 주지 않았다. 그러므로 MTA는 주요 염증 발현인자 COX-2 생성을 유도하지 않으며, COX-2 pathway의 최종 산물인 prostaglandin E2 생성에도 영향을 주지 않을 것으로 보인다.

본 논문에서는 LPS에 의한 COX-2 mRNA 발현에 대한 MTA의 영향도 평가하였으며, 이를 위해 LPS와 MTA를 동시에 세포에 적용하고 LPS 단독적용 시의 COX-2 mRNA 발현 정도와 비교하였다. Figure 2B에서 나타난 바와 같이, 대부분의 MTA는 LPS에 의한 COX-2 mRNA 발현을 억제하지 못했으나, 수화된 Ortho MTA에서만 약간의 저해효과를 보였다. 그러나 통계적으로 저해효과가 확인되었지만, 약간의 저해는 생물학적으로 크게 의미가 없을 것으로 판단된다.

## 사람 치수세포 ALP 활성화에 대한 MTA의 영향



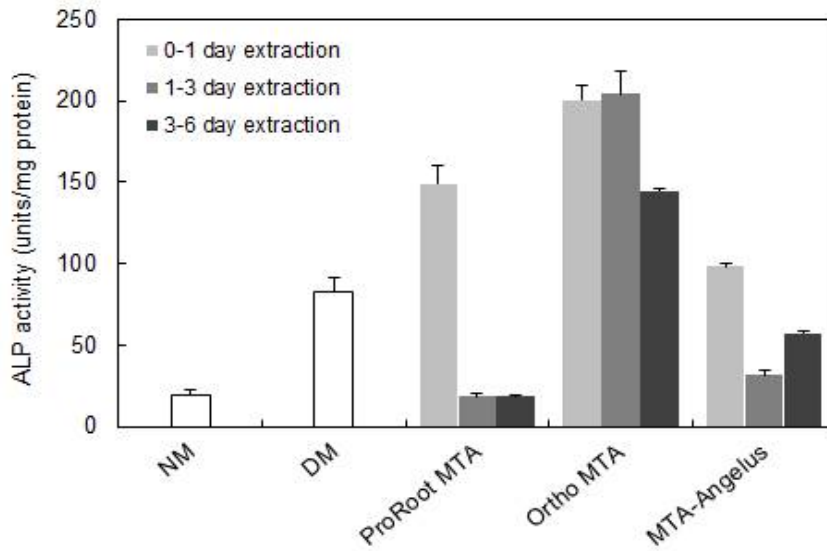
**Figure 2.** Cox-2 mRNA expression in RAW 264 cells treated of MTA extracts (A) and co-treated with MTA extracts and LPS (B). Each value represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* in (B) indicates a significant difference compared to LPS (50 ng/mL)-treated control.

이전의 연구에서 조골세포와 치수세포 분화에 대한 MTA의 효과는 이미 보고되었으나, 분화 촉진인자의 방출시기는 아직 보고된 바가 없다. 본 논문에서는 MTA의 추출시간에 따른 ALP 활성을 관찰하고자, MTA 추출시기를 (1) 0-1일, (2) 1-3일, (3) 3-6일로 나누어 추출액을 얻었다. 즉, (2)와 (3)그룹은 각각 (1), (2)그룹에서 추출에 사용된 MTA를 다시 사용함으로써 추출구간을 달리하였다.

치수세포를 1일 동안 추출한 MTA 추출물의 50% 희석액으로 6일 동안 분화 유도 배지 (Differentiation induction media, DM)에서 처리한 경우, ProRoot MTA, Ortho MTA가 현저한 ALP활성 상승을 일으켰다. Ortho MTA는 음성대조군 (DM)의 약 2.4배로 가장 높은 상승을 보였으며, ProRoot MTA는 약 1.8배, 그리고 MTA-Angelus는 1.2배 정도로서 ALP 활성이 대조군보다 약간 높은 활성을 보였다 (Figure 3). 1-3일 및 3-6일간 추출물은 MTA의 종류에 따라 큰 차이를 보였다. Ortho MTA는 3-6일간 추출물이 0-1일과 1-3일간 추출물보다 ALP 활성 촉진 효과가 감소하였으나, 여전히 음성대조군 (DM)보다 높은 ALP 활성을 유도하였다. ProRoot MTA와 MTA-Angelus는 1-3일 및 3-6일간 추출물이 음성대조군 (DM)보다 낮은 ALP 활성을 초래하는, 저해효과를 보였다.

따라서 ProRoot MTA와 MTA-Angelus는 ALP 활성을 촉진하는 성분 및 저해하는 성분을 방출하며, 방출농도는 활성 촉진성분이 0-1일간에 높으며, 이후에는 급격히 감소하는 것으로 보인다. 저해성분의 경우, 촉진 성분보다 지속적으로 방출되는 것으로 판단된다. Ortho MTA는 적어도 6일간의 추출물에서는 ALP 활성 저해가 보이지 않았는데 그 원인은, 촉진 성분이 6일동안 지속되었을 수도 있으며, 저해성분이 방출되었지만 촉진





**Figure 3.** ALP activity of HDP cells treated with MTA extracts. Each value represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. NM and DM are DME media without and with differentiation-inducing factors, respectively.

성분보다 농도가 낮아서 저해효과가 상쇄되었을 수도 있다.

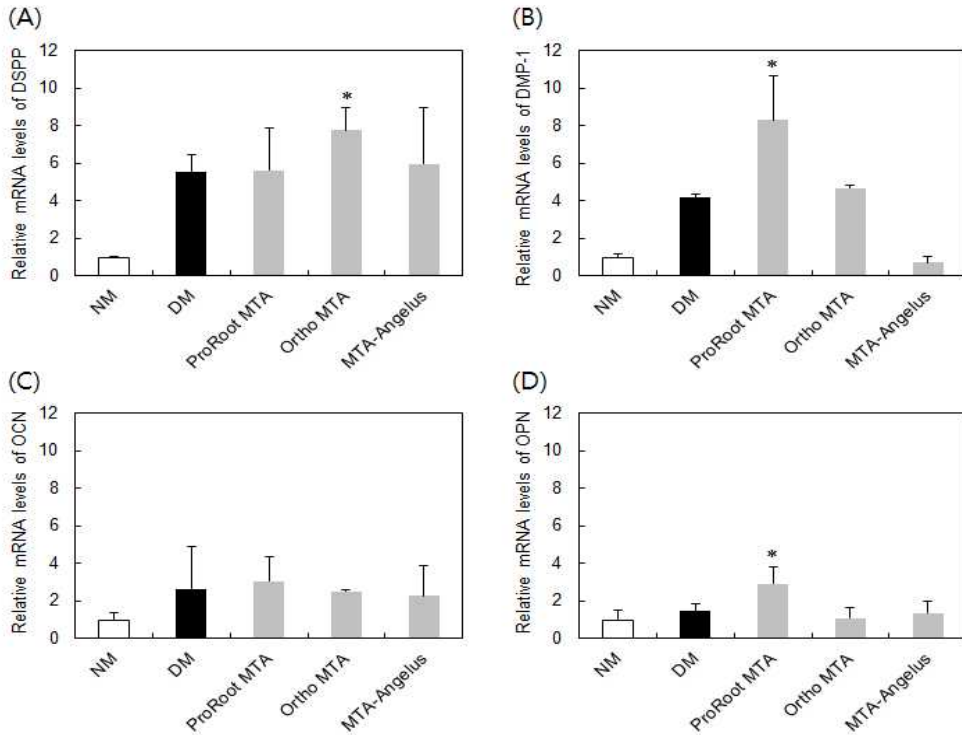
## 사람 치수세포의 분화관련 유전자 발현에 대한 MTA의 영향

치수세포는 상아질 분화 시에 DSPP, DMP-1, OCN, OPN과 같은 세포의 기질 단백질 발현을 동반하는 것으로 알려져 있으며, 이 중 DSPP와 DMP-1은 치수세포의 분화에 특징적으로 나타나는 단백질로서 골분화와 상아질분화를 구별할 수 있는 표지로 이용된다. 본 연구에서는 이들 단백질 유전자의 mRNA 발현에 대한 MTA 추출액 (0-1일)의 영향을 조사하였다.

DSPP의 경우, 정상배지 (normal medium, NM)에 비하여, 분화 촉진인자가 포함된 배지 (DM)에서 약 5배 정도 mRNA 발현이 증가하였다 (Figure 4A). DM에 MTA 추출물이 첨가될 경우 (MTA 추출물 최종농도 50%), ProRoot MTA와 MTA-Angleus의 발현 촉진효과는 없었으며, Ortho MTA가 미약하지만 통계적으로 의미있는 증가를 유도하였다. 이는 ALP 활성과 부합되는 결과라고 할 수 있다.

그러나, DMP-1의 경우, ProRoot MTA에서 가장 높은 증가를 보였으며, MTA-Angelus는 mRNA 발현을 저해하였다 (Figure 4B). Ortho MTA는 대조군과 유사한 정도의 발현을 유도하였다. 즉, DMP-1은 DSPP mRNA 발현과 다른 양상을 보였다.

OCN는 시험된 모든 MTA에 크게 영향을 받지 않았으며 (Figure 4C), OPN은 ProRoot MTA만이 mRNA 발현을 촉진하였다 (Figure 4D).



**Figure 4.** mRNA expression of DSPP (A), DMP-1 (B), OCN (C) and OPN (D) in HDP cells treated with MTA extracts. Each value represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. NM and DM are DME media without and with differentiation-inducing factors, respectively. \* indicates a significant difference compared to DM control.

## II-4. 고찰

MTA는 수화과정을 거치면서 세포독성이 경감되는 경향을 보였고, 전반적으로 세포독성은 매우 경미한 수준인 것으로 판단된다. 본 실험에서는 Ortho MTA와 MTA-Angelus가 비슷한 정도의 경미한 세포독성을 보였고 ProRoot MTA가 가장 적은 수준의 세포독성을 보였다. 이는 추출물을 이용하였을 경우이며, MTA를 직접 세포에 적용하는 임상적 경우, 실험 결과보다는 더 강한 세포독성을 나타낼 것으로 보인다. Koulaouzidou 등은 MTA-Angelus와 ProRoot MTA는 비슷한 수준의 세포독성을 보이며 그 양상이 매우 경미하여 임상적용에 추천된다고 보고하였고 (18), De Deus 등은 MTA-Angelus와 Gray MTA의 독성실험을 통하여 처음 24시간 동안에는 endothelial cell의 활성을 저하시키지만 48,72시간에는 독성이 감소하여 대조군과 차이가 없어진다고 보고하였다 (30).

Macrophage의 COX-2 발현에는 MTA가 영향을 주지 않았으므로, MTA는 *in vivo* 에서 염증발현이 미약하거나, COX-2를 거치지 않는 염증발현을 초래할 것으로 보인다. 따라서 MTA에 의한 염증발현은 interleukin과 같은 cytokine 발현과 관련될 가능성이 있는데, Koh 등의 연구에 의하면 MTA가 몇몇 cytokine (IL-1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 6)의 분비를 증가시킨다는 결과를 보고하였다 (31). Cavalcanti 등은 MTA가 특히 IL-1 $\beta$  와 IL-8 분비를 촉진하여 초기 염증반응을 유도한다고 보고하였다 (32). 이외에도 MTA는 IL-2, 4 분비를 촉진하여 각각 T세포, B세포를 활성화시키고 IL-10을 활성화하여 항염증반응을 매개한다고 보고하였다 (33). 그러나 이러한 MTA의 염증 유도는 초기에 국한되며 그 정도가 경미하여 치수복조

제로 적용되기에는 적합하다고 할 수 있다.

시판되고 있는 MTA는 그 종류와 추출시기에 따라 치수세포의 ALP 활성에 대한 영향이 달랐는데, 초기 추출물이 가장 강한 분화 촉진효과를 지니고 있는 것으로 보였다. 한편 ProRoot MTA와 MTA-Angelus는 1-3일, 3-6일 추출물에서 ALP 활성 저해효과를 보였는데, 그 이유는 제조 과정에 기인한 것으로 보인다. ProRoot MTA와 MTA-Angelus는 portland cement를 정제하여 bismuth oxide와 혼합하는 것으로 알려져 있으며, Ortho MTA는 cement에 필요한 성분을 조합하여 제조한다. 따라서 ProRoot MTA와 MTA-Angelus는 Ortho MTA보다 다양한 성분을 포함하고 있을 가능성이 크며, ALP 활성 저해는 이러한 제조과정의 차이에서 유래할 수 있다. Ortho MTA의 Cd, Cu, Fe, Mn, Ni 농도가 ProRoot MTA보다 매우 낮다는 연구결과 (34)와 As가 Ortho MTA에서는 검출되지 않지만 ProRoot MTA에서는 미량 검출되었다는 보고 (35)를 종합해 볼 때, ProRoot MTA와 MTA Angelus같이 portland cement를 정제하여 제조된 MTA는 Ortho MTA보다 중금속 함량이 더 높은 것으로 보이며, 이는 1일 이후의 ALP 활성저해 현상의 원인이 될 수 있을 것으로 보이나 특정 성분과 ALP 활성저해와의 상관관계에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

분화관련 유전자 발현에 대한 영향은, ALP 활성에 대한 영향보다는 상대적으로 미약하나, ProRoot MTA와 Ortho MTA는 치수세포의 상아모세포분화를 촉진하였다고 할 수 있다. 위에서 언급한 바와 같이, 본 실험에는 0-1일간 추출액을 사용하였으므로, 1일 이후의 추출액을 사용할 경

우, ProRoot MTA의 영향은 사라지거나, 혹은 저해효과가 나타날 가능성이 있다. 실험에서 언급된 분화관련 유전자들은 세포외기질의 광화와 관련되어 있는데 치수세포의 세포외기질 광화에 미치는 MTA의 영향 평가가 필요하다.

## II-5. 결론

본 논문에서는 MTA를, 세포독성, 염증발현, 분화관련 유전자 발현 실험 등을 통하여 치수복조제로서 재평가하였다. 사람 치수세포의 분화관련 유전자 발현에 대한 MTA제품 간의 결과가 상이하고 ALP 활성화에 대한 영향 또한 각 제품의 추출물의 시간에 따라 결과가 다르지만 전반적으로 세포독성 및 염증유발이 경미하고 사람 치수세포 분화유도에 긍정적인 영향을 미친다는 점에서 치수복조제로서의 적합성을 확인했다고 본다. 사람 치수세포 분화에 대한 영향은, MTA의 종류와 추출시기에 따라 달랐는데 추출시간에 따른 추출물 성분변화를 추적하여 MTA의 치수세포 분화유도 효과에 대한 영향을 분석할 필요가 있을 것으로 보인다. 본 논문에서는 *in vitro* 실험을 통하여 MTA의 사람 치수세포의 분화유도를 고찰해 보았으나 향후 치수세포의 분화에 대한 *in vivo* 연구가 뒤따라야 할 것으로 보인다.

### Ⅲ. 플라보노이드의

## 사람 치수세포분화에 대한 영향 및 신호전달경로

### Ⅲ-1. 서론

천연 식물추출물인 flavonoid와 terpenoid와 같은 저분자 물질들은 의학적인 용도로서 골다공증을 치료하거나 뼈를 생성하기 위해 다양하게 연구되어 왔다. 이러한 물질들은, 골 생성반응을 촉진시키므로 상아모세포 분화에도 관련 가능성이 높고, 단백질계 생리 활성 물질보다 취급이 용이한 저분자 물질이라는 점에서, 치수복조술식의 성공률을 높이기 위한 MTA의 보조약제 및 전처리약제로서 조명할 만한 가치가 있다.

가장 대표적인 플라보노이드인 quercetin과 kaempferol은 MG-63 human osteoblasts의 ALP 활성을 촉진하는 것으로 알려졌고 (34), 쥐를 이용한 실험에서 kaempferol은 새로운 골형성을 유도한다고 보고되었다 (35). 또한 genistein은 골을 형성하고 사람의 골수 유래 줄기세포의 지방분화를 촉진하는 것으로 보고되었다 (36). 더욱이 quercetin은 조골세포에 대하여 NF- $\kappa$ B를 억제하면서 smad 활성을 촉진하는 것으로 보인다 (37). 또한 위에서 언급한 플라보노이드와 부분적으로 구조적 차이점을 갖는 baicalin과 baicalein도 조골세포의 분화를 촉진하는 것으로 보고되었다 (38,39).

Quercetin과 kaempferol은 extracellular regulated kinase (ERK) 경로와 estrogen receptor (ER) 경로를 통하여 조골세포의 분화를 증진시키는 반면 (34), baicalin은 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호체계를 통하여 골형성에 관

여하는 것으로 알려져 있는데, 이는 플라보노이드간의 구조가 다르면 골형성을 일으키는 기전도 다르다는 것을 제시하고 있다.

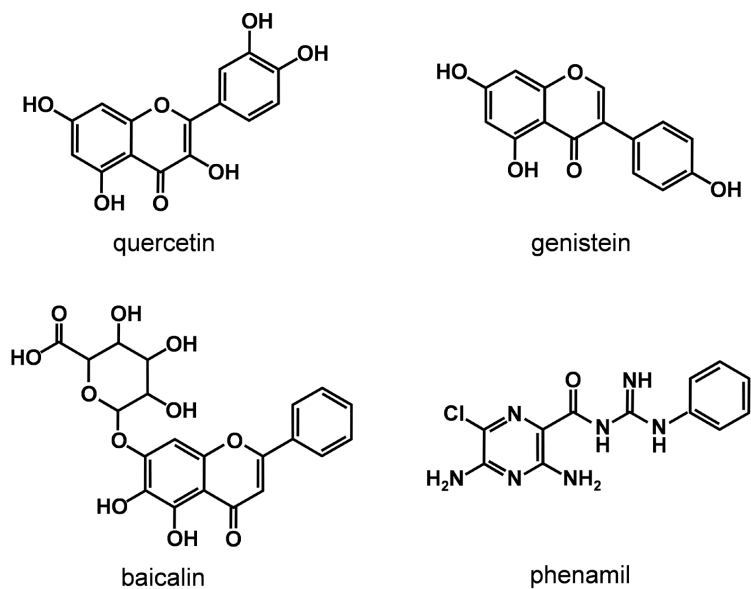
플라보노이드 외에 retinoid와 amiloride같은 다른 종류의 저분자 물질도 조골세포의 분화를 촉진하는 것으로 보고된 바 있다 (40,41). 나트륨 채널 억제제로 알려진, amiloride의 일종인 phenamil은 조골세포의 분화와 광화를 유도하는 것으로 나타났다 (41). Phenamil은 또한 poly (lactide-co-glycolide acid) (PLGA) scaffold에 첨가되어 골형성 촉진에 기여하는데, 이는 골 조직공학에서 유용하게 쓰일 가능성을 시사한다 (42).

위에 언급된 골형성능을 가진 저분자 물질들과 관련하여 조골세포의 분화나 광화 등에 대한 연구는 있었으나 치수세포와 상아모세포에 대해서는 연구가 활발하게 진행되지 않았다. Retinoic acid가 쥐의 치수세포에서 osteopontin 발현을 증가시키고 (43), *Drynaria fortunei* 에서 추출한 전체 플라보노이드가 calcified nodule 형성 및 ALP 활성을 증가시킨다고 보고되었지만 (44), 순수 플라보노이드가 치수세포 분화에 미치는 영향은 아직 연구되지 않았다.

본 논문에서는 사람의 치수세포를 서로 다른 3개의 플라보노이드 (genistein, baicalin, quercetin) 및 phenamil과 배양하여 ALP 활성, OCN과 DSPP의 mRNA 발현, 광화정도를 알아보았다. Quercetin, genistein, baicalin, phenamil의 화학구조는 Figure 5에 있다.

또한 플라보노이드의 상아질 형성효과에 관여하는 신호전달경로를 알아보기 위하여 quercetin과 함께 ER 경로 억제제 또는 ERK 경로 억제제를 첨가하여 사람 치수세포를 배양한 후, ALP 활성을 측정해 보았다.





**Figure 5.** Chemical structures of quercetin, genistein, baicalin, and phenamil.

## III-2. 실험 방법

### 시약

세포배양에 사용된 배지 및 시약은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. 특별히 언급되지 않은 시약은 Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 사람 치수세포 추출 및 배양

사람 치수세포는 서울대학교 치과병원 기관윤리위원회 (IRB)의 승인을 받아 교정 목적으로 발거된 치아를 사용하였다. 치아는 70% ethanol로 닦아내고 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 수세한 후 무균적인 방법으로 치근단을 잘라서 치수를 추출하였다. 분리된 치수세포는 20% FBS와 항생 물질용액 (100 U/mL penicillin-g, 100µg/mL streptomycin)을 포함한 minimal essential medium (MEM)에 담근 후 조각을 넣어 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37℃에서 배양하였다. 배지는 3일마다 교환하였다. 배양 20일째 trypsin으로 세포를 취하고 새로운 MEM에 재배양하여 second passage를 얻었다. 본 실험에서 사용된 세포는 fifth passage이다.

### 세포독성시험

세포독성은 Cell Counting Kit-8 (WST-8; Dojindo Laboratories, Gumamoto, Japan)으로 측정하였다. MEM 배지에서 플라보노이드와 phen-

amil의 농도를 다양하게 하여 (1-50 $\mu$ M) 24시간 동안 사람 치수세포에 적용한 후, 치수세포를 PBS에서 세척하고 WST-8 10%가 포함된 신선한 MEM에서 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 배양하였다. 배양 1시간 후, plate reader (Sunrise, TECAN, Salzburg, Austria)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

### ALP 활성 측정

사람 치수세포의 ALP 활성 측정은 4-nitrophenyl phosphate 비색측정법으로 평가하였다. 간단히 기술하면, MEM에서 confluent까지 배양한 후, 분화배지 (MEM including 50 $\mu$ g/mL ascorbic acid, 10 $^{-8}$ M dexamethasone, 2mM  $\beta$ -glycerophosphate)에서 6일간 재배양했다. 처리된 세포를 PBS에서 세척한 후, 1.5M MgCl<sub>2</sub> 10 $\mu$ l와 alkaline buffer solution (67mM 4-nitrophenyl phosphate; Fluka, Buchs, Switzerland) 140 $\mu$ L를 각 well에 주입했다. 37 $^{\circ}$ C에서 30분 후, 0.5M NaOH를 첨가하여 반응을 종료시키고, 405nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 총 세포단백질 1mg당 효소 활성으로 나타내었다. 단백질 함량은 bicincho-ninic acid (BCA) 단백질 측정 kit (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 측정하였다.

### Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용한 유전자 발현 측정

Quercetin과 phenamil의 DSPP, OCN의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 사람 치수세포를 quercetin 및 phenamil과 10일간 처리하였다. RNA extraction reagent (WelPrep Total RNA Isolation Reagent; Welgene Inc., Daegu, Korea)로 total RNA를 추출하고 cDNA synthesis kit (Poer cDNA Synthesis kit; iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)로 cDNA를 합성하였다 (29). RT-PCR은 10 $\mu$ L SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio, Otsu, Japan), 0.4 $\mu$ L ROX Reference Dye II (Takara Bio), cDNA 및 primer가 포함된 혼합물 (20 $\mu$ L)에서 진행되었으며, primer는 ABI PRISM 7500 Sequence Detection System Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 열순환 처리하였다. 사용된 primer의 sequence와 열순환 처리조건은 이전에 기술하였다. DSPP와 OCN 유전자 발현은 C<sub>T</sub>값을 바탕으로 표현하였고, GAPDH의 C<sub>T</sub>값에 대한 비로 나타내었다.

## 광화측정

Alizarin red S로 염색하여 세포외기질의 광화를 관찰하였다 (45). 분화 배지에서 사람 치수세포를 quercetin과 phenamil에 25일간 처리하였다. Paraformaldehyde로 1일 동안 고정한 후, 증류수로 세척하고 alizarin red S 용액으로 10분간 염색하였다. 그 후, 수돗물로 세척하고 실온에서 건조하였다. Alizarin red S의 정량방법은 modified cetylpyridinium method에 의거하였다 (45).

## Western blot

Quercetin의 ERK 인산화 및 DSPP와 OCN 발현에 대한 영향을 western blot으로 분석하였다. ERK 인산화 분석실험을 위해서 사람 치수세포를 PD98059 (ERK1/2 inhibitor)와 함께 2.5 $\mu$ M quercetin에 6시간 동안 노출시켰고, DSPP와 OCN 발현실험을 위해서는 사람 치수세포를 10일 동안 quercetin으로 처리하였다.

Western blot 분석을 위하여 4℃에서 15분간 세포를 cold NP-40 lysis buffer (pH 7.6) (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 1 $\mu$ g/ml pepstatin, 1 $\mu$ g/ml leupeptin, 1 $\mu$ g/ml aprotinin, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride)에 용해시켰다. 세포 용해물을 수집하여 10분간 원심분리 (14,000  $\times$  G)하였다. 용해물의 단백질 농도는 protein measurement kit (Pro-Measure; iNtRON Biotechnology)로 측정하였고 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 적용하였다. 전기영동 후 단백질은 polyvinylidene difluoride transfer membrane (Hybond-P; Amersham Biosciences, Bucks, England)으로 옮겨져서 PBST (PBS containing 6% low-fat milk and 0.1% Tween 20)로 처리하였다.

Blot은 monoclonal mouse anti-pERK1/2 Ig, monoclonal mouse anti-DSPP Ig 혹은 polyclonal rabbit anti-OCN Ig과 함께 PBST에서 1시간동안 배양하고 PBST로 두 번 수세한 후, goat anti-mouse Ig 혹은 goat anti-rabbit secondary Ig conjugated to horseradish peroxidase 로 탐침하였다. Chemiluminescence kit (WEST-ZOL plus Western Blot Detection System; iNtRON Biotechnology)와 luminescent image

analyzer (LAS 1000 plus; Fuji PhotoFilm, Tokyo, Japan)로 단백질 밴드를 관찰하였다. Polyclonal rabbit anti-GAPDH Ig로 blot을 재탐침하였다. 실험에 사용된 모든 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

## 통계처리

모든 실험값은 각각 독립적인 3번의 실험 결과의 평균이며, 통계 처리가 필요한 경우 실험군과 대조군간의 값을 Student's t-test로 비교하였으며,  $p < 0.05$ 일 때 혹은  $p < 0.01$  일 때 유의한 것으로 정의하였다.

### III-3. 실험 결과

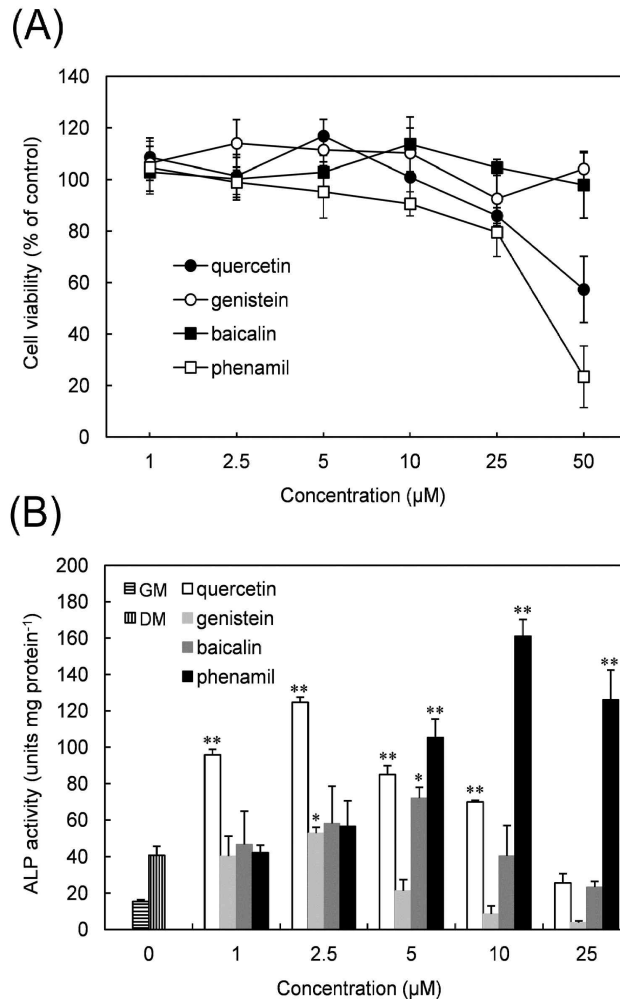
세 종류의 플라보노이드와 phenamil이 사람 치수세포의 viability와 ALP 활성화에 미치는 영향

ALP 활성측정을 위한 최적의 농도를 결정하기 위하여 quercetin, genistein, baicalin, phenamil의 독성을 평가하였다. 상기 시료들의 농도를 달리하면서 24시간 동안 사람 치수세포에 노출시켰다 (농도: 1-50 $\mu$ M).

Figure 6A에서 보는 바와 같이 quercetin과 phenamil은 높은 농도에서 독성을 보이는 반면 genistein과 baicalin은 실험 조건의 어떠한 농도에서도 세포의 활성화에 영향을 주지 않았다. 50 $\mu$ M 농도에서 quercetin과 phenamil은 세포 활성을 각각 대조군 대비 57.3%, 23.4% 감소시켰다. 이에 따라 ALP 활성을 평가하기 위한 실험에서는 시약의 농도를 1-25 $\mu$ M로 하기로 하였다.

분화유도배지 (DM)에 플라보노이드와 phenamil를 첨가하면 치수세포의 ALP 활성이 증가하였다 (Figure 6B). 플라보노이드 중에서는 quercetin이 ALP 활성을 가장 많이 유도하였다. 1-10 $\mu$ M 사이의 농도에서 통계적으로 유의할 만한 ALP 활성증가를 보였는데 2.5 $\mu$ M 농도에서 최대치를 보였다. 반면에 genistein과 baicalin에서는 ALP 활성이 단일 농도에서만 증가되는데 (각각 2.5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M), 이는 ALP 활성을 촉진하는 농도의 범위가 quercetin보다 좁다는 것을 의미한다.

플라보노이드와 비교해서 phenamil의 효과는 더 두드러졌으며 상대적으로 더 높은 농도 (5-25 $\mu$ M)에서 효과적이었다. 10 $\mu$ M에서 phenamil은 약 4배의 ALP 활성 증가를 보였다. 각 시료에서 보인 ALP 활성 최대치에



**Figure 6.** Effects of small chemicals on cell viability (A) and ALP activity (B) in HDP cells. For the cytotoxicity assay, the cells were treated with the chemicals at various concentrations for 24 h. Cell viability was expressed as a percentage relative to the untreated control cells. For the ALP activity assay, HDP cells were incubated in normal growth media (GM) and differentiation-inducing media



(DM) with or without the test chemicals for 6 days. The ALP activities of the test groups were compared with that of untreated cells cultured in DM. Each value represents the mean  $\pm$  SD obtained from the triplicate experiments. In the ALP activity results, \* and \*\* indicate significant differences between the DM control group and the test groups at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

근거하면 phenamil이 가장 효과적이었으며 quercetin, baicalin, genistein의 순이다.

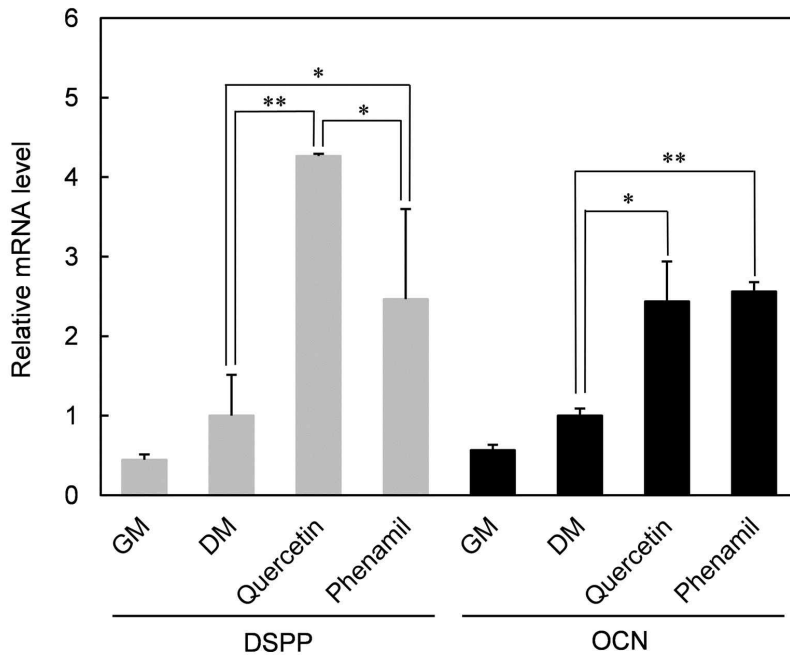
Baicalin과 genistein의 효과는 미비했으므로 이후에 진행된 실험에서는 quercetin과 phenamil만을 사용하였다.

## Quercetin과 phenamil이 DSPP와 OCN mRNA 발현에 미치는 영향

사람 치수세포에 quercetin 또는 phenamil를 첨가한 실험군과 시료를 첨가하지 않은 대조군으로 나누어 10일간 성장배지 (GM)와 분화배지 (DM)에 각각 배양한 후, quercetin과 phenamil이 사람 치수세포의 상아질 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 RT-PCR로 DSPP와 OCN mRNA를 측정하였다. Figure 6B에서 ALP 최대 활성을 보인 농도에서 최종 농도를 정했다 (quercetin 2.5 $\mu$ M, phenamil 10 $\mu$ M).

mRNA 수치는 분화배지 (DM)의 mRNA를 기준으로 비교하였다. Figure 7에서 보는 바와 같이 quercetin과 phenamil에 의해 DSPP와 OCN mRNA 발현이 모두 상승하였다. DSPP mRNA 발현의 경우, quercetin과 phenamil에 의해 각각 4.2배, 2.6배의 발현 증가를 보였고, OCN mRNA의 경우, quercetin과 phenamil은 비슷한 수준 (약 2.5배)으로 발현을 증가시켰다.

본 실험에 사용된 농도에서 상아질 광화에 필수적인 DSPP에 대한 효과만을 고려했을 때, 상아질 분화를 유도하는 효과에 있어서는 quercetin이 phenamil 보다 더욱 효과적인 것으로 보인다.



**Figure 7.** mRNA expression of DSPP and OCN in quercetin- and phenamil-treated cells. HDP cells were incubated in normal growth media (GM) and differentiation-inducing media (DM) with or without quercetin (2.5  $\mu$ M) and phenamil (10  $\mu$ M) for 10 days. mRNA expression was then analyzed by RT-PCR. The mRNA expression levels of the target genes were normalized to GAPDH expression levels. Each value represents the mean  $\pm$  SD obtained from the triplicate experiments. \* and \*\* indicate significant differences between the values at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

## Quercetin과 phenamil이 세포외기질의 광화에 미치는 영향

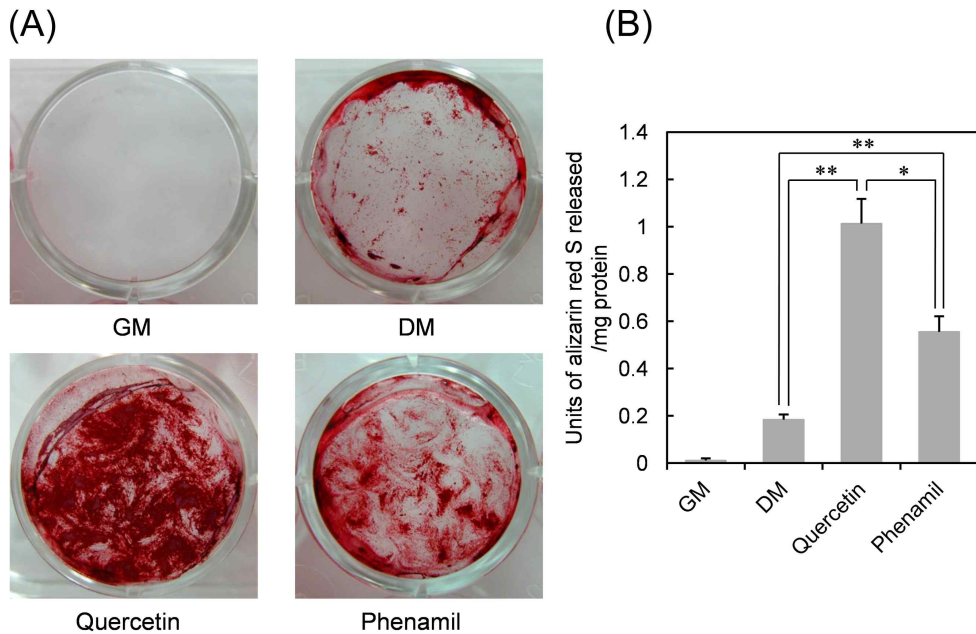
Quercetin과 phenamil을 사람 치수세포에 첨가하여 25일간 배양하였다. 분화배지에서는 가장자리에서만 광화가 관찰되었지만 시료를 첨가한 실험군에서는 광화가 매우 진하고 균일하게 관찰되었다 (Figure 8A). Phenamil보다는 quercetin으로 처리한 세포에서 광화정도가 더 높게 나타났는데, 이는 Figure 7의 DSPP mRNA 발현이 보여주는 결과와 일치한다.

## ICI 182,780과 PD98059가 quercetin으로 처리한

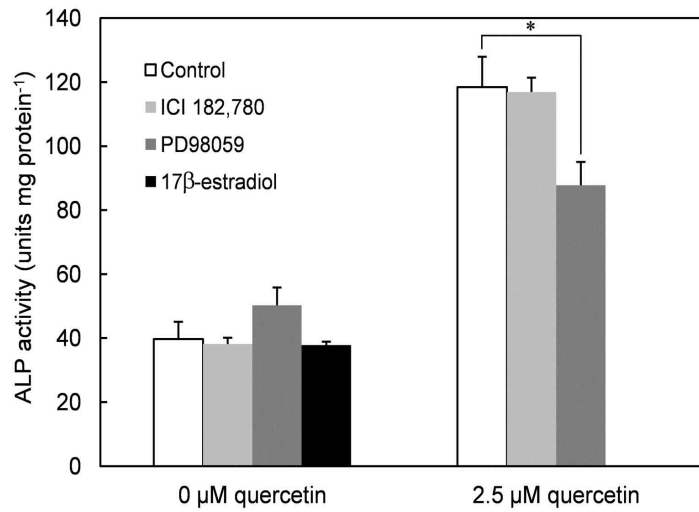
### 사람 치수세포의 ALP 활성에 미치는 영향

일반적으로 quercetin과 같은 플라보노이드는 포유류의 ER에 결합하는 것으로 알려져 있는데, 이는 ER-dependent pathway를 통해서 골분화 유도가 가능함을 시사한다. Quercetin이 사람 치수세포로부터 상아질을 유도하는 경우에도 ER pathway에 의존하는 지 알아보기 위하여 quercetin으로 처리한 세포에 ICI 182,780 (ER inhibitor)와 PD98059 (ERK 1/2 inhibitor)를 첨가하고 ALP 활성을 측정하였다. Figure 9에서 보는 바와 같이 ICI 182,780은 quercetin으로 처리한 사람 치수세포의 ALP 활성에 영향을 주지 않았다. 적어도 분화의 초기단계에서는 quercetin의 상아모세포분화 활성에 ER이 관여하지 않는 것으로 보인다.

한편,  $17\beta$ -estradiol은 사람 치수세포의 ALP 활성을 증가시키지 않았는데 이는 치수세포의 ER 활성으로는 ALP 활성이 어렵다는 것을 증명한



**Figure 8.** Mineralization of HDP cells exposed to quercetin and phenamil. HDP cells were treated with quercetin (2.5 $\mu$ M) and phenamil (10 $\mu$ M) in differentiation media. As negative controls, the cells were incubated in normal media (GM) and differentiation media (DM). After incubation for 25 days, the cultures were stained with alizarin red S (A), and the degree of mineralization was quantitated by dissolving alizarin red S and measuring the absorbance (B). Each value represents the mean  $\pm$  SD obtained from the triplicate experiments. \* and \*\* indicate significant differences between the values at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.



**Figure 9.** Effects of ICI 182,780 and PD89059 on the ALP activity of quercetin-treated HDP cells. Cells were co-treated with quercetin and 1μM ICI 182,780 or 10μM PD89059 for 6 days. Cells were also treated with 10nM 17β-estradiol in differentiation media. Each value represents the mean  $\pm$  SD obtained from the triplicate experiments. \* indicates significant differences between the values at  $p < 0.05$ .

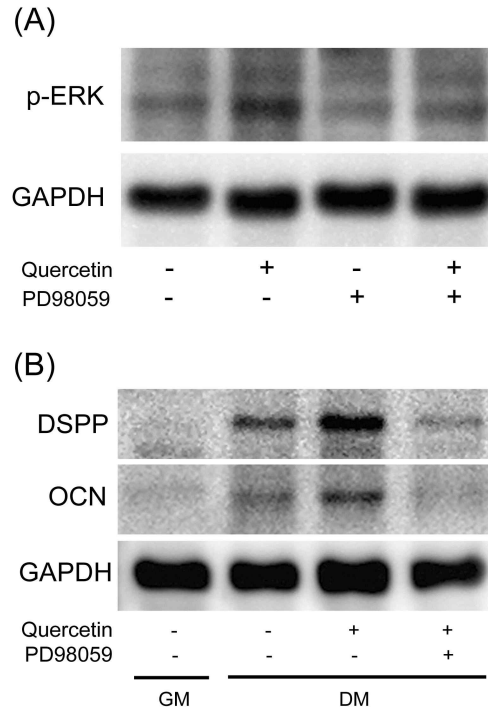
다. 조골세포가 ER 활성화로 골분화를 유도하는 기전과는 대조된다.

반면, PD98059는 quercetin으로 처리한 세포의 ALP 활성을 감소시켰는데 이는 non-ER dependent pathway를 통한 ERK의 활성화가 quercetin의 ALP 활성 촉진에 부분적으로 관여한다는 것을 시사한다.

## Quercetin처리한 사람 치수세포에서 pERK, DSPP, OCN 발현

Quercetin으로 처리한 세포의 분화에 ERK pathway가 관여하는 지 알아보기 위하여 western blot을 통하여 ERK의 인산화를 관찰하였다. Figure 10A에서 보는 바와 같이 quercetin은 ERK를 활성화시키며 PD 98059를 함께 넣었을 때 그 효과가 저해되었다. DSPP와 OCN의 발현이 증가된 것을 통해서 quercetin이 상아모세포 분화를 촉진시킨다는 것을 확인할 수 있다 (Figure 10B). DSPP 발현이 OCN 발현보다 더 두드러졌는데 이는 Figure 7에서 보인 mRNA 발현 패턴과 일치한다.

PD98059를 넣지 않고 quercetin으로 처리한 세포와 비교해서 PD98059를 첨가한 경우에 DSPP와 OCN 발현이 줄었는데 이는 quercetin이 ERK pathway를 통해서 사람 치수세포의 분화를 유도한다는 것을 제시하는 결과이다.



**Figure 10.** Protein expression of p-ERK, DSPP and OCN in quercetin-treated HDP cells. For the analysis of p-ERK, cells were treated with quercetin (2.5  $\mu$ M) and PD98059 (10  $\mu$ M) for 6 hrs in differentiation media (A). For the analysis of DSPP and OCN expression, HDP cells were treated with quercetin and PD98059 for 10 days in differentiation media (DM) (B). Untreated cells in normal growth media (GM) was used as a control.



### III-4. 고찰

상아모세포 분화 활성을 조사하기 위하여 조골세포 분화 유도능이 있는 세 종류의 플라보노이드 (flavonol, isoflavonoid, flavone)를 선택하였다. 실험에 쓰인 플라보노이드 중에서는 quercetin (flavonol류)이 사람 치수세포의 ALP 활성을 가장 강하게 증가시켰다. 상아모세포에 특이하게 나타나는 DSPP 단백질의 mRNA 발현 또한 quercetin에 의해 증가되었다.

세포외기질의 광화가 증가되는 것은 quercetin으로 처리한 세포에서 DSPP가 유도되는 것과 관련된다. Genistein (isoflavonoid류)과 baicalin (flavone류) 또한 ALP 활성을 약간 증가시키기는 했지만 quercetin보다는 효과가 미미하였다. 그러나 구조가 서로 다른 플라보노이드가 사람 치수세포의 ALP 활성을 증가시킨다는 사실은, 플라보노이드가 정도의 차이는 있지만 일반적으로 상아질 분화유도 기능이 있다는 것을 말해준다.

세포의 성장, 증식, 분화, 소멸 등에 mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway가 관여한다고 알려져 있는데 (46,47), ERK-1,2는 MAPK의 한 부류이다. Quercetin은 ERK signaling pathway를 통하여 조골세포의 분화를 촉진하며 그 과정에서 ER이 관여하는 것으로 보고되었다 (34). Estrogen은 조골세포의 분화를 증진시킨다고 알려져 있는데 (48, 49), quercetin과 같은 플라보노이드와 estradiol은 구조적으로 유사해서 ER이 플라보노이드와 직접 상호작용하여 Src/Ras/ERK signaling pathway를 통해 조골세포의 분화를 일으키는 것으로 보인다 (50, 51).

ERK의 인산화는 조골세포의 분화 (52, 53)와 치수세포의 분화 (54,55)에 중요한 역할을 하므로 ER과 ERK signaling pathway가 quercetin에

의한 상아질 형성과정에도 관여할 것으로 예상하였다. 그러나 실험 결과에 따르면 quercetin에 의한 분화 초기단계에서는 ER이 관여하지 않는 것으로 보인다. Figure 9에서 보는 바와 같이 ICI 182,780 (ER inhibitor)은 quercetin의 활성을 억제하지 못했다. 또한 강력한 체내 에스트로겐으로 알려진  $17\beta$ -estradiol이 치수세포의 ALP 활성을 촉진하지 못했으므로, 이는 quercetin이 ER 경로를 통해 치수세포의 분화를 유도한다는 가설과 배치된다.

아직까지는 치수세포나 상아모세포의 ER에 대한 연구가 충분하지 않다. Jukic 등은 immunohistochemical staining을 통해서 ER이 상아모세포에는 발견되지만 사람 치수세포에서는 관찰되지 않는다고 하였다 (56). 이는 분화과정이 끝난 직후 또는 분화과정의 마지막에 ER이 발현된다는 것을 시사한다. 따라서 quercetin이 ALP 활성에 미치는 영향이 ER과 무관한 이유는, 사람 치수세포에 ER이 존재하지 않기 때문인 것으로 보인다.

반면 ERK signaling pathway는 quercetin의 활동에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. PD98059 (ERK1/2 inhibitor)에 의하여 quercetin의 ALP 활성, DSPP와 OCN 발현이 저해되었다 (Figure 9, 10B). 그러나 quercetin의 분화 유도과정에서 ERK의 upstream effectors는 아직까지 보고된 바 없다.

Quercetin과 비교해서 phenamil은 더 높은 농도에서 치수세포의 ALP 활성을 유도하였다 (Figure 6). 그러나 phenamil은 세포외기질에 칼슘이온 축적을 촉진시키는 데 있어서는 quercetin보다 효과적이지 않았다. (Figure 8). 이는 phenamil로 처리한 세포에서 DSPP mRNA 발현이 상대적으로 낮은 결과와 연관된다. 따라서 *in vitro* 실험 결과만을 고려했을

때, 치수세포의 분화를 촉진시키는 능력은 phenamil 보다 quercetin이 우수하다고 할 수 있다.

이전의 연구에 따르면, phenamil은 smad 발현을 안정화함으로써 BMP 신호전달을 활성화하여 상아모세포분화를 유도한다고 알려져 있다 (41). smad는 또한 치수세포의 BMP induced-odontogenic differentiation에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데 (57,58) 이는 phenamil의 분화 유도능력이 smad 증가에 기인하는 것을 의미한다.

### III-5. 결론

골형성에 관여하는 것으로 알려진 플라보노이드를 대상으로, 사람 치수세포 분화촉진 실험 결과, ERK pathway를 통하여 사람 치수세포의 분화를 촉진하는 것이 확인되었다. 플라보노이드 중 quercetin이 분화 촉진효과가 가장 탁월하였다. 상아질 재생에 있어서 생활성 저분자 물질의 유용성을 확인하고 임상에 적용하기 위해서는 향후 *in vivo* 연구가 필요할 것으로 보인다.

## IV. 종합결론

치수의 생활력을 위협하는 요소로부터 치수를 보호하여 그 생활력을 보존하는 치수복조술식에 있어서, 현재로서는 MTA를 이용한 치수복조술이 가장 높은 성공률을 보인다고 알려져 있다. MTA는 치수세포 뿐만 아니라 조골세포에 대해서도 분화능력을 가지고 있는데, 이는 조골세포의 분화를 촉진하는 물질들이 치수세포의 분화에도 관여하여 상아모세포 유도를 촉진하는 치수복조제로 적용이 가능하리라는 것을 시사한다. 이러한 가정 하에, 조골세포를 활성화 시키는 것으로 확인된 성장인자 등의 물질을 대상으로 치수세포로부터 상아모세포 분화를 촉진하는 것을 확인하는 많은 연구가 있었다. 성장인자의 경우, 우수한 분화능력을 지니지만 임상적으로 적용되기에는 제약이 많다. 성장인자가 가진 단점을 극복하는 물질로서 조작과 저장이 용이한 생활성 저분자 물질인 플라보노이드는, 사람 치수세포에 대한 분화능력을 검증해 볼 만한 가치가 있다.

이에 본 논문에서는 우선 MTA의 치수복조제로서의 적합성을 확인하고, 그 종류 및 추출시기에 따라 치수세포 분화에 대한 영향이 다르다는 것을 살펴보았다. 또한 플라보노이드가 ERK 경로를 통하여 사람 치수세포 분화에 긍정적인 영향을 미친다는 사실을 확인하였다.

치수복조술에 플라보노이드가 보조적으로 이용되기 위해서는 *in vivo* 연구를 통해 그 유용성과 효과가 입증되어야 할 것이다. 추후 플라보노이드를 MTA와 함께 치수복조술에 적용하여 dentin bridge형성을 촉진하는 시너지 효과가 입증된다면 현재 MTA 치수복조술의 성공률과 치유속도를 더 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. Hilton TJ. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Oper Dent* 2009; 34: 615-625.
2. Zander HA. Reaction of the pulp to calcium hydroxide. *J Dent Res* 1939; 18: 373-379.
3. Olsson H, Petersson K, Rohlin M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. *Int Endo J* 2006; 39: 429-442.
4. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghanavati F, Rahimi H. A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 2008; 106: 609-614.
5. D'Arcangelo C, Di Nardo-Di Maio F, Patrono C, Caputi S. NOS evaluations in human dental pulp-capping with MTA and calcium hydroxide. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; 20: 27-32.
6. Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endo J* 2008; 41: 128-150.
7. Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral

- trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endo J* 2003; 36: 225-231.
8. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP, Using mineral trioxide aggregate as a pulp capping material. *J Am Den Asso* 1996; 127: 1491-1494.
  9. Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, Bauer JR, Grande RH, Murata SS, Souza V, Holland R. Evaluation of two mineral trioxide aggregate compounds as pulp-capping agents in human teeth. *Int Endo J* 2009; 42: 122-128.
  10. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effects of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endo* 2008; 34: 1057-1060.
  11. Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endo* 2007; 33: 836-839.
  12. Perinpanayagam H, Al-Rabeah E. Osteoblasts interact with MTA surfaces and express Runx2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 2009; 107: 590-596.
  13. Hashiguchi D, Fukushima H, Yasuda H, Masuda W, Tomikawa M, Morikawa K, Maki K, Jimi E. Mineral trioxide aggregate

- inhibits osteoclastic bone resorption. *J Dent Res* 2011; 90: 912-917.
14. Thesleff I, Vaahtokari A. The role of growth factors in determination and differentiation of the odontoblastic cell lineage. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88(suppl 1): 357-68.
  15. Lovschall H, Fejerskov O, Flyvbjerg A. Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGFI) in rat molars. *Adv Dent Res* 2001; 15: 108-12.
  16. Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res* 1994; 73: 1515-1522.
  17. Sloan AJ, Rutherford RB, Smith AJ. Stimulation of the rat dentine-pulp complex by bone morphogenetic protein-7 in vitro. *Arch Oral Bio* 2000; 45: 173-177.
  18. Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. In vitro evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA-Angelus. *J Oral Sci* 2008; 50: 397-402.
  19. Ding SJ, Kao CT, Chen CL, Shie MY, Huang TH. Evaluation of human osteosarcoma cell line genotoxicity effects of mineral trioxide aggregate and calcium silicate cements. *J Endo* 2010; 36: 1158-1162.
  20. Barbosa Silva MJ, Vieira LQ, Sobrinho AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse

- pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 2008; 105(5): e70-e76.
21. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endo* 2000; 26: 288-291.
  22. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 2006; 101: 258-261.
  23. Kim EC, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 2008; 105: e54-e57.
  24. Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endo J* 2009; 42: 227-237.
  25. Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Kakoei S, Samiee M. A Comparative study of using a combination of calcium chloride and mineral trioxide aggregate as the pulp-capping agent on dogs' teeth. *J Endo* 2011; 37: 786-788.
  26. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydrox-



- ide cement. Dent Traum 2011; 17: 163-166.
27. Zhu T, Lim BS, Park HC, Son KM, Yang HC. Effects of the iron-chelating agent deferoxamine on triethylene glycol dimethacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate, hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. J Biome Mater Res Part B: Appl Biomater 2012; 100(1): 197-205.
  28. Kim NR, Lim BS, Park HC, Son KM, Yang HC. Effects of N-acetylcysteine on TEGDMA- and HEMA-induced suppression of osteogenic differentiation of human osteosarcoma MG63 cells. J Biomed Mater Res PartB: Appl Biomater 2011; 98(2): 300-307.
  29. Kim NR, Park HC, Kim I, Lim BS, Yang HC. In vitro cytocompatibility of N-acetylcysteine-supplemented dentin bonding agents. J Endo 2010; 36: 1844-1850.
  30. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. Int Endo J 2005; 38: 604-609.
  31. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. J Biomed Mater Res 1997; 37: 432-439.
  32. Cavalcanti BN, Rode Sde M, França CM, Marques MM. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 $\beta$

- and IL-8 by migrating human neutrophils. *Braz Oral Res.* 2011; 25(1): 13-18.
33. Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 73: 123-128.
  34. Kum KY, Zhu Q, Safavi K, Gu Y, Bae KS, Chang SW. Analysis of six heavy metals in Ortho mineral trioxide aggregate and ProRoot mineral trioxide aggregate by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Aust Endod J* 2013; 39(3): 126-130.
  35. Chang SW, Baek SH, Yang HC, Seo DG, Hong ST, Han SH, Lee Y, Gu Y, Kwon HB, Lee W, Bae KS, Kum KY. Heavy metal analysis of ortho MTA and ProRoot MTA. *J Endo* 2011; 37(12): 1673-1676.
  36. Prouillet C, Mazière J-C, Mazière C, Wattel A, Brazier M, Kamel S. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 1307-1313.
  37. Yang L, Takai H, Utsunomiya T, Li X, Li Z, Wang Z, Wang S, Sasaki Y, Yamamoto H, Ogata Y. Kaempferol stimulates bone sialoprotein gene transcription and new bone formation.

- J Cell Biochem 2010; 110: 1342-1355.
38. Heim M, Frank O, Kampmann G, Sochocky N, Pennimpede T, Fuchs P, Hunziker W, Weber P, Martin I, Bendik I. The Phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinol* 2004; 145: 848-859.
  39. Yamaguchi M, Weitzmann MN. Quercetin, a potent suppressor of NF- $\kappa$ B and Smad activation in osteoblasts. *Int J Mol Med* 2011; 28(4): 521-525.
  40. Guo AJ, Choi RC, Cheung AW, Chen VP, Xu SL, Dong TT, Chen JJ, Tsim KW. Baicalin, a flavone, induces the differentiation of cultured osteoblasts: an action via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Biol Chem* 2011; 286(32): 27882-27893.
  41. Kim JM, Lee SU, Kim YS, Min YK, Kim SH. Baicalein stimulates osteoblast differentiation via coordinating activation of MAP kinases and transcription factors. *J Cell Biochem* 2008; 104: 1906-1917.
  42. Nakayama Y, Takahashi K, Noji S, Muto K, Nishijima K, Taniguchi S. Functional modes of retinoic acid in mouse osteoblastic clone MC3T3-E1, proved as a target cell for retinoic acid. *FEBS Lett* 1990; 261: 93-96.
  43. Park KW, Waki H, Kim WK, Davies BS, Young SG, Parhami

- F, Tontono P. The small molecule phenamil induces osteoblast differentiation and mineralization. *Mol Cell Biol* 2009;29: 3905-3914.
44. Lo KW, Ulery BD, Kan HM, Ashe KM, Laurencin CT. Evaluating the feasibility of utilizing the small molecule phenamil as a novel biofactor for bone regenerative engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2012 Jul 19 [Epub online ahead of print]
  45. Ohishi M, Horibe M, Ikeda D, Miyazaki M, Ohishi K, Kataoka M, Kido J, Nagata T. Effect of retinoic acid on osteopontin expression in rat clonal dental pulp cells. *J Endo* 1999; 25: 683-685.
  46. Huang XF, Yuan SJ, Yang C. Effects of total flavonoids from *Drynaria fortunei* on the proliferation and osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. *Mol Med Rep* 2012; 6(3): 547-552.
  47. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol* 2006; 22: 39-46.
  48. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-735.
  49. Neary JT. MAPK cascades in cell growth and death. *News Physiol Sci* 1997; 12: 286-293.

50. Qu Q, Perälä-Heape M, Kapanen A, Dahllund J, Salo J, Väänänen HK, Härkönen P. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone* 1998; 22: 201-209.
51. Qu Q, Härkönen PL, Väänänen HK. Comparative effects of estrogen and antiestrogens on differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *J Cell Biochem* 1999; 73: 500-507.
52. Kousteni S, Han L, Chen JR, Almeida M, Plotkin LI, Bellido T, Manolagas SC. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest* 2003; 111: 1651-1664.
53. Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F. Activation of the Src/p21<sup>ras</sup>/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 1998; 17: 2008-2018
54. Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV, Cheng SL. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 14443-14450.
55. Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, Reith E, Benson MD, Franceschi RT. Bone morphogenic proteins, extracellular matrix and mitogen-activated protein kinase signaling pat-

- hways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 101-110.
56. Lee SY, Kim SY, Park SH, Kim JJ, Jang JH, Kim EC. Effects of recombinant dentin sialoprotein in dental pulp cells. *J Dent Res* 2012; 91: 407-412.
  57. Karanxha L, Park SJ, Son WJ, Nör JE, Min KS. Combined effects of simvastatin and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Endo* 2013; 39: 76-82.
  58. Jukić S, Prpić-Mehićić G, Talan-Hranilović J, Miletić I, Segović S, Anić I. Estrogen receptors in human pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 2003; 95: 340-344.
  59. Qin W, Yang F, Deng R, Li D, Song Z, Tian Y, Wang R, Ling J, Lin Z. Smad 1/5 is involved in bone morphogenetic protein-2-induced odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endo* 2012; 38: 66-71.
  60. Washio A, Kitamura C, Morotomi T, Terashita M, Nishihara T. Possible involvement of smad signaling pathways in induction of odontoblastic properties in KN-3 cells by bone morphogenetic proteins-2: A growth factor to induce dentin regeneration. *Int J Dent* 2012; 2012: 258469 (article ID).

Abstract

Effects of Dental Mineral Trioxide Aggregate on  
Inflammatory Factors and Differentiation of Human Dental  
Pulp Cells, and Differentiation-Stimulatory Effects of  
Quercetin and Phenamil

Jong-Gil Kim, D.D.S., M.S.D.

Department of Dental Biomaterials Science, Graduate School,  
Seoul National University.

( Directed by Prof. Hyeong-Cheol Yang, Ph.D.)

Pulp capping is to preserve the vitality and health of an exposed pulp rather than replace it with a root filling material following pulp exposure. Dentin formation is a prerequisite in the healing response of the pulp to pulp capping agents during vital pulp therapy. Calcium hydroxide has been considered the gold standard for this procedure. However, previous studies have reported the failures with the use of calcium hydroxide. MTA (Mineral trioxide aggregate) has proved to be effective in pulp capping, but the studies for more predictable and successful treatment outcome are still being conducted with osteogenic molecules such as growth factors and so on. Among the molecules proven to be osteogenic, flavonoids

are worth considering because of small sizes and the ease of manipulation and storage. The aims of this study are to investigate various molecular aspects of cellular reactions involved in inflammation and differentiation with commercially available MTAs (ProRoot MTA, Ortho MTA and MTA-Angelus) and to evaluate the odontogenic activity of small molecules (three flavonoids and phenamil) that have been known to induce osteoblast differentiation. mRNA of COX-2 gene which is involved in inflammatory reaction was not increased by all tested MTAs, and expression of COX-2 by lipopolysaccharide was not severely altered by MTAs, demonstrating that COX-2 is not involved in inflammatory reactions to MTA. The extracts of all MTAs obtained for early 24 hrs increased ALP activities of human dental pulp (HDP) cells, while the extracts of ProRoot MTA and MTA-Angelus obtained for 1-3 and 3-6 days decreased alkaline phosphatase (ALP) activity, indicating the presence of inhibitory components in the two MTAs. ProRoot MTA enhanced mRNA levels of DMP-1, but not DSPP. However, the other MTAs did not affect mRNA expression of DSPP, DMP-1, OCN and OPN, which is not consistent with ALP activities. Among the flavonoids (quercetin, genistein, and baicalin), quercetin induced the highest ALP activity of HDP cells. Phenamil, an amiloride derivative, exhibited higher ALP activity than quercetin. However, increased expression of dentin sialophosphoprotein (DSPP) mRNA and



mineralization of HDP were seen in cells treated with quercetin compared with phenamil. This indicates that quercetin is the most odontogenic agent among the tested chemicals. The increase in ALP activity in the quercetin-treated cells was not affected by ICI 162,780, an estrogen receptor inhibitor, and was partially blocked by PD98059, an ERK1/2 inhibitor. This result suggests that ERK1/2 is activated in the quercetin-induced differentiation of HDP cells without the mediation of estrogen receptors which are known to be involved in osteoblast differentiation by quercetin. Further studies are needed to conclude the synergetic effects of MTA and flavonoids on differentiation of dental pulp cells.

---

Key words: human dental pulp cells, odontogenic differentiation, MTA, Quercetin, Phenamil, ERK

Student number: 2008-31051